

日本国特許庁^{of}
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2002年10月24日
Date of Application:

出願番号 特願2002-309686
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2002-309686]

出願人 富士写真フィルム株式会社
Applicant(s):

2003年9月16日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫

【書類名】 特許願
 【整理番号】 P27050J
 【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿
 【国際特許分類】 G01N 33/53
 G01N 21/76
 G01N 33/535

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フィルム株式会社内

【氏名】 中嶌 賢二

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フィルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100073184

【弁理士】

【氏名又は名称】 柳田 征史

【選任した代理人】

【識別番号】 100090468

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐久間 剛

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008969

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814441

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法および生化学
解析装置

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を
有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、レセプタまたは
リガンドを前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記レセプタまたは
リガンドを特異的に結合させ、該レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して
検出する特異的結合検出工程を備え、この特異的結合検出工程において前記吸
着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッセイ法において、

前記強制的に流動させる溶液に、溶存気体を減少させる気体減少処理を施した
ものを用いることを特徴とする生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法。

【請求項2】 リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を
有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、レセプタまたは
リガンドを前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記レセプタまたは
リガンドを特異的に結合させ、該レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して
検出する特異的結合検出工程を備え、この特異的結合検出工程において前記吸
着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッセイ法において、

前記溶液の流動中に、該溶液中に存在する気泡を除去する除去処理を行うこと
を特徴とする生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法。

【請求項3】 リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を
有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、レセプタまたは
リガンドを前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記レセプタまたは
リガンドを特異的に結合させ、該レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して
検出する特異的結合検出工程を備え、この特異的結合検出工程において前記吸
着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッセイ法において、

前記溶液の流動中に、該溶液中に存在する気泡を溶解させる溶解処理を行うこ
とを特徴とする生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法。

【請求項4】 前記特異的結合検出工程が、リガンドまたはレセプタが結合

された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、標識物質によって標識された標識レセプタまたは標識リガンドを含む反応溶液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記リガンドまたはレセプタに前記標識レセプタまたは標識リガンドを特異的に結合させ、該標識レセプタまたは標識リガンドを前記標識物質を利用して検出するものであることを特徴とする請求項1、2または3記載の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法。

【請求項5】 前記特異的結合検出工程が、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、標識物質によって標識された標識体を含む反応溶液を前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記レセプタまたはリガンドに前記標識体を特異的に結合させ、該レセプタまたはリガンドを前記標識体を利用して検出するものであることを特徴とする請求項1、2または3記載の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法。

【請求項6】 前記特異的結合検出工程が、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、補助物質が結合された補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドを特異的に結合させ、前記補助物質に特異的に結合可能な標識物質を含む反応溶液を前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドと特異的に結合させ、該補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドを前記標識物質を利用して検出するものであることを特徴とする請求項1、2または3記載の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法。

【請求項7】 リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットを内部に着脱可能に取り付ける取付部を有し、前記リガンドまたはレセプタと該リガンドまたはレセプタと特異的に結合する特異的結合物質とを結合させるための反応容器と、該反応容器内に前記特異的結合物質を含む反応溶液を前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させる流動手段とからなる生化学解析装置であって、

さらに、流動している前記反応溶液から該反応溶液中に存在する気泡を除去する除去手段を備えていることを特徴とする生化学解析装置。

【請求項 8】 リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットを内部に着脱可能に取り付ける取付部を有し、前記リガンドまたはレセプタと該リガンドまたはレセプタと特異的に結合する特異的結合物質とを結合させるための反応容器と、該反応容器内に前記特異的結合物質を含む反応溶液を前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させる流動手段とからなる生化学解析装置であって、

さらに、流動している前記反応溶液に該反応溶液中に存在する気泡を溶解させる溶解手段を備えていることを特徴とする生化学解析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、レセプタまたはリガンドを検出するアッセイ法に関し、詳しくは多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットを利用して、レセプタまたはリガンドを検出するアッセイ法および生化学解析装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、例えば、スライドガラス板やメンブレンフィルタなどを用いたガラスアレイやメンブレンアレイの担体表面上の異なる位置に、ホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アブザイム、その他のタンパク質、核酸、cDNA、DNA、RNAなど、生体由来の物質と特異的に結合可能で、かつ、塩基配列や塩基の長さ、組成、特性などが既知のリガンドまたはレセプタをスポットアレイ装置を用いて滴下した後、これを固定し、次いで、ホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アブザイム、その他のタンパク質、核酸、DNA、mRNAなどの抽出、単離などによって生体から採取された、あるいは、採取された後に化学的処理が施された物質であって、蛍光物質、蛍光色素などの蛍光標識物質によって標識された標識されたレセプタまたはリガンドを、ハイブリダイゼーション等によって吸着性領域に固定されたりガンドまたはレセプタと特異的に結合させ、続

いて励起光を照射して、蛍光物質、色素などの標識物質から発せられた蛍光を光電的に検出して、生体由来の物質を解析する解析システムが開発されている。

【0003】

この解析システムによれば、メンブレンフィルタなどの担体表面上の異なる位置に、数多くのリガンドまたはレセプタのスポットを高密度に形成して、蛍光標識物質によって標識されたレセプタまたはリガンドをハイブリダイズさせること等によって、短時間で生体由来の物質を解析することが可能になるという利点がある。

【0004】

これらの解析システムにおいても、充分な精度で検出できることはもちろん、検出限界の向上や再現性が要求されている。しかし、上述の蛍光標識物質を利用した解析システムは、検出感度が低いために発現解析に必要な標識レセプタまたは標識リガンドを大量に必要とする。また、ガラスアレイ上に固定化できるリガンドまたはレセプタの量が少ない上、解析操作の工程でアレイ上に固定化されたリガンドまたはレセプタが剥がれ落ちる等の問題がある。

【0005】

【特許文献1】

特許第2837276号公報

【0006】

【非特許文献1】

「nature genetics」Vol.21, p.25-p.32(1999)

【0007】

【非特許文献2】

「バイオインダストリー」Vol.18, p.13-p.19(2001)

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

従来、上記解析システムにおいては、ハイブリダイゼーション等を行う際に、実験者が手作業で、リガンドまたはレセプタが固定されたアレイをハイブリダイゼーションバッグ内に入れ、ハイブリダイゼーションバッグ内に標識レセプタま

たは標識リガンドを含む反応溶液を加え、ハイブリダイゼーションバッグに振動を加えて標識レセプタまたは標識リガンドを対流あるいは拡散によって移動させて、リガンドまたはレセプタに標識レセプタまたは標識リガンドを特異的に結合させるいわゆる振盪方式によって行うのが一般的であった。

【0009】

しかし、振盪方式の場合、ハイブリダイゼーション反応溶液中の標識レセプタまたは標識リガンドをリガンドまたはレセプタを含む多数の吸着性領域に、効率よく拡散させることは困難であり、リガンドまたはレセプタと標識レセプタまたは標識リガンドとを効率的にハイブリダイズさせることができないという問題がある。ハイブリダイゼーション反応溶液中の標識レセプタまたは標識リガンドをリガンドまたはレセプタを含む多数の吸着性領域に効率的に拡散させることができないと、標識レセプタまたは標識リガンドが結合していない吸着性領域の発光量（ノイズあるいはバックグラウンド）に対する、標識レセプタまたは標識リガンドが結合した量に対応する発光量（信号）の比（S/N比）が低く、吸着性領域に結合する標識レセプタまたは標識リガンドが微量となると検出することが困難になるという問題がある。

【0010】

標識レセプタまたは標識リガンドを吸着性領域の内部にまで充分に浸透させるためには、反応溶液を強制的に吸着性領域内部に循環させればいいと考えられるが、反応溶液を強制的に吸着性領域内部に循環させるために反応溶液を加圧すると、反応溶液が吸着性領域を通過後、反応溶液に加わる圧力が減少し、いわゆるキャビテーションによって気泡が発生する。この発生した気泡は吸着性領域の表面に付着して、反応溶液の流れに偏りをもたらし、S/N比の低下や吸着性領域の位置によってS/N比がばらつくという問題を生じさせる。また、吸着性領域の表面に付着した気泡がその後の標識レセプタまたは標識リガンドの検出の障害になる場合もある。

【0011】

本発明は上記事情に鑑みなされたものであり、反応溶液を強制的に吸着性領域内部に循環させた場合に、S/N比の低下や吸着性領域の位置によってS/N比

のばらつきを生じさせることのない生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法および生化学解析装置を提供することを目的とするものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドを前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記レセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、該レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出する特異的結合検出工程を備え、この特異的結合検出工程において前記吸着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッセイ法において、前記強制的に流動させる溶液に、溶存気体を減少させる気体減少処理を施したもの用いることを特徴とするものである。

【0013】

この場合、強制的に流動させる全ての溶液が、溶存気体を減少させる気体減少処理を施したものであってもよいし、例えば、レセプタまたはリガンドを含む溶液のみが、溶存気体を減少させる気体減少処理を施したものであってもよい。

【0014】

また、別の態様として、本発明の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドを前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記レセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、該レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出する特異的結合検出工程を備え、この特異的結合検出工程において前記吸着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッセイ法において、前記溶液の流動中に、該溶液中に存在する気泡を除去する除去処理を行うことを特徴とするものである。この場合、強制的に流動させる溶液に、溶存気体を減少させる気体減少処理を施したもの用いてもよい。

【0015】

さらに別の態様として、本発明の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法

は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドを前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記レセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、該レセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出する特異的結合検出工程を備え、この特異的結合検出工程において前記吸着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッセイ法において、前記溶液の流動中に、該溶液中に存在する気泡を溶解させる溶解処理を行うことを特徴とするものである。この場合も、強制的に流動させる溶液に、溶存気体を減少させる気体減少処理を施したもの用いてもよい。

【0016】

前記特異的結合検出工程は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、標識物質によって標識された標識レセプタまたは標識リガンドを含む反応溶液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記リガンドまたはレセプタに前記標識レセプタまたは標識リガンドを特異的に結合させ、該標識レセプタまたは標識リガンドを前記標識物質を利用して検出するものとすることができる。

【0017】

また、前記特異的結合検出工程は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、標識物質によって標識された標識体を含む反応溶液を前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記レセプタまたはリガンドに前記標識体を特異的に結合させ、該レセプタまたはリガンドを前記標識体を利用して検出するものであってもよい。

【0018】

さらに、前記特異的結合検出工程は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの前記リガンドまたはレセプタに、補助物質が結合された補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドを特異的に結合させ、前記補助物質に特異的に結合可能な標識物質を含む反応溶液を前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させて前記補助物質結合レセプタ

または補助物質結合リガンドと特異的に結合させ、該補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドを前記標識物質を利用して検出するものであってもよい。

【0019】

本発明の生化学解析装置は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットを内部に着脱可能に取り付ける取付部を有し、前記リガンドまたはレセプタと該リガンドまたはレセプタと特異的に結合する特異的結合物質とを結合させるための反応容器と、該反応容器内に前記特異的結合物質を含む反応溶液を前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させる流動手段とからなる生化学解析装置であって、さらに、流動している前記反応溶液から該反応溶液中に存在する気泡を除去する除去手段を備えていることを特徴とするものである。

【0020】

また、本発明の生化学解析装置の別の態様は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットを内部に着脱可能に取り付ける取付部を有し、前記リガンドまたはレセプタと該リガンドまたはレセプタと特異的に結合する特異的結合物質とを結合させるための反応容器と、該反応容器内に前記特異的結合物質を含む反応溶液を前記吸着性領域を横切るように強制的に流動させる流動手段とからなる生化学解析装置であって、さらに、流動している前記反応溶液に該反応溶液中に存在する気泡を溶解させる溶解手段を備えていることを特徴とするものである。

【0021】

【発明の効果】

本発明の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドを吸着性領域を横切るように強制的に流動させてレセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、このレセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出する特異的結合検出工程を備え、この特異的結合検出工程において吸着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッ

セイ法において、強制的に流動させる溶液に、溶存気体を減少させる気体減少処理を施したもの用いるので、キャビテーションによる気泡の発生を抑制することができ、吸着性領域の表面に気泡が付着することによって反応溶液の流れに偏りが生ずることが抑えられ、S/N比の低下や吸着性領域の位置によってS/N比のばらつきが生ずることを抑制することができる。また、吸着性領域の表面に付着した気泡がその後の標識レセプタまたは標識リガンドの検出の障害になることも抑制することが可能となる。

【0022】

また、上記アッセイ法において、溶液の流動中に、溶液中に存在する気泡を除去する除去処理を行う場合、あるいは溶液の流動中に、溶液中に存在する気泡を溶解させる溶解処理を行う場合にも同様の効果を得ることが可能となる。

【0023】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。図1は本発明のアッセイ法に用いられる生化学解析用ユニットの概略斜視図である。図1に示す生化学解析用ユニット1は、孔3が複数設けられた基板2と、孔3の内部に充填され、多孔性材料が基板2と接着された吸着性領域4とからなる。この吸着性領域4には、構造または特性が既知のリガンドまたはレセプタ5が滴下され、その後の処理により固定化されている。

【0024】

基板2の材質としては、生化学解析用ユニット内部での散乱を防止するために、放射線または光を透過させないか、減衰させる材質が好ましく、金属、セラミックが好ましい。また、孔を開ける加工が容易であるプラスチックを基板として用いる場合は、放射線または光をより一層減衰させるために、粒子をプラスチック内部に分散させることが好ましい。

【0025】

金属としては、銅、銀、金、亜鉛、鉛、アルミニウム、チタン、錫、クロム、鉄、ニッケル、コバルト、タンタルあるいは、ステンレス鋼や黄銅などの合金が好ましくあげられる。セラミックとしては、アルミナ、ジルコニア、マグネシア

、石英などが好ましくあげられる。プラスチックとしては、ポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィン、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレートなどのアクリル樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリフッ化ビニリデン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリカーボネート、ポリエチレンナフタレートやポリエチレンテレフタレートなどのポリエステル、ナイロン-6やナイロン-6, 6などの脂肪族ポリアミド、ポリイミド、ポリスルフォン、ポリフェニレンサルファイド、ポリジフェニルシロキサンなどのケイ素樹脂、ノボラックなどのフェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリウレタン、酢酸セルロースやニトロセルロースなどのセルロース類、ブタジエンースチレン共重合体などのコポリマー、さらにはプラスチックをブレンドしたものなどが好ましくあげられる。

【0026】

基板2に開ける孔3の開口部の面積（サイズ）は、孔3の密度を高めるために、一般には 5 mm^2 未満であり、好ましくは 1 mm^2 未満であり、 0.3 mm^2 未満がより好ましく、さらには 0.01 mm^2 未満であることが好ましい。そして、より好ましくは 0.001 mm^2 以上であることが好ましい。

【0027】

孔3のピッチ（隣接する二つの孔の中心から中心までの距離）は $0.05\sim3\text{ mm}$ の範囲であることが好ましく、孔3の間隔（隣接する二つの孔の端部から端部までの最短距離）は、 $0.01\sim1.5\text{ mm}$ の範囲であることが好ましい。孔3の数（密度）は、一般には $10\text{ 個}/\text{cm}^2$ 以上であり、好ましくは $100\text{ 個}/\text{cm}^2$ 以上、より好ましくは $500\text{ 個}/\text{cm}^2$ 以上、さらには $1000\text{ 個}/\text{cm}^2$ 以上であることが好ましい。そして、好ましくは $10000\text{ 個}/\text{cm}^2$ 以下、さらには $1000\text{ 個}/\text{cm}^2$ 以下であることが好ましい。なお、必ずしも、孔3は全て図1に示したように等間隔で設けられている必要はなく、幾つかのブロック（単位）に別れてブロック毎に複数の孔が設けられていてもよい。

【0028】

本発明において、吸着性領域を形成する多孔性材料としては、多孔質材料あるいは纖維材料が好ましく使用される。また、多孔質材料と纖維材料とを併用して

吸着性領域を形成することもできる。本発明において、吸着性領域を形成するために使用される多孔性材料は、有機材料、無機材料のいずれでもよく、有機／無機複合体でもよい。

【0029】

吸着性領域を形成するために使用される有機多孔質材料は、特に限定されるものではないが、活性炭などの炭素多孔質材料あるいはメンブレンフィルタを形成可能な多孔質材料が好ましく用いられる。メンブレンフィルタを形成可能な多孔質材料としては、溶媒に溶解可能なポリマーが好ましく用いられる。溶媒に溶解可能なポリマーとしては、セルロース誘導体（例えば、ニトロセルロース、再生セルロース、セルロースアセテート、酢酸セルロース、酪酸酢酸セルロースなど）、脂肪族ポリアミド類（例えば、ナイロン6、ナイロン6,6、ナイロン4,10など）、ポリオレフィン類（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレンなど）、含塩素ポリマー類（例えば、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデンなど）、フッ素樹脂類（例えば、ポリフッ化ビニリデン、ポリテトラフルオライドなど）、ポリカーボネート、ポリスルファン、アルギン酸及びその誘導体（例えば、アルギン酸、アルギン酸カルシウム、アルギン酸／ポリリシンポリイオンコンプレックスなど）、コラーゲンなどがあげられ、これらポリマーの共重合体や複合体（混合体）も用いることができる。

【0030】

また、吸着性領域を形成するための繊維材料としては、特に限定されるものではないが、好ましくは前述したセルロース誘導体類、脂肪族ポリアミド類などがあげられる。

【0031】

吸着性領域を形成するために使用される無機多孔質材料は、特に限定されるものではないが、好ましくは、金属（例えば、白金、金、鉄、銀、ニッケル、アルミニウムなど）、金属等の酸化物（例えば、アルミナ、シリカ、チタニア、ゼオライトなど）、金属塩（例えば、ヒドロキシアパタイト、硫酸カルシウムなど）及びこれらの複合体などがあげられる。

【0032】

基板2に複数の孔3を開ける方法としては、ピンで打ち抜くパンチング、電極に高電圧をパルス状に印加して基板を揮発する放電加工、エッチング、レーザー照射などがあげられる。基板の材料が、金属材料またはプラスチック材料の場合は、基板の表面にコロナ放電またはプラズマ放電を施して接着剤を塗工した後、吸着性領域を形成するための多孔性材料をプレスなどの手段により貼り合わせることで生化学解析用ユニットが作製される。貼り合わせる際に、吸着性領域を形成するための多孔性材料を加熱して軟化すると、孔内部に吸着性領域が容易に形成される。また、基板に吸着性領域を形成するための多孔性材料をプレスする場合には、基板と吸着性領域を形成するための材料を、事前に1枚毎に分割してから間欠的にプレスしてもよいし、基板と吸着性領域を形成するための材料をそれぞれ長尺帯状としたものを2つのロール間に連続搬送してもよい。

【0033】

なお、本発明の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法においては、上記の材料や方法によって作製した生化学解析用ユニットを使用することも可能であるが、市販されている生化学解析用ユニットを用いてもよく、また多孔性の吸着性領域にリガンドまたはレセプタがすでに結合されている生化学解析用ユニットを用いることも可能である。

【0034】

本発明の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドを吸着性領域を横切るように強制的に流動させてレセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、このレセプタまたはリガンドを標識物質を利用して検出する特異的結合検出工程を備え、この特異的結合検出工程において吸着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッセイ法において、強制的に流動させる溶液に、溶存気体を減少させる気体減少処理を施したもの用いることを特徴とする。

【0035】

特異的検出工程の態様としては、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、標識

物質によって標識された標識レセプタまたは標識リガンドを含む反応溶液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させてリガンドまたはレセプタに標識レセプタまたは標識リガンドを特異的に結合させ、この標識レセプタまたは標識リガンドを標識物質を利用して検出するものがあげられる。

【0036】

多孔性の吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタは、ホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アブザイム、その他のタンパク質、核酸、cDNA、DNA、RNAなどであって、特性、組成、構造あるいは塩基配列や塩基の長さなどが既知のものである。

【0037】

標識レセプタまたは標識リガンドは、多孔性の吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと特異的に結合するホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アブザイム、その他のタンパク質、核酸、DNA、mRNAなどの抽出、単離などによって生体から採取された、あるいは、採取された後に化学的処理が施され、標識物質によって標識されたものである。

【0038】

標識物質は、標識物質そのものが放射線、発光、発色あるいは光を照射することによって蛍光を放出するものであっても、標識物質に何らかの化学物質を接触させて、標識物質によって化学物質が分解あるいは反応する等して発光、発色あるいは蛍光を放出するものであってもよい。前者の標識物質としては、放射線物質にRI（放射性同位体）、発光物質にアクリジニウムエステル等、発色物質に金コロイド粒子等、蛍光物質にフルオレセイン等を用いることができる。また、後者の標識物質としては、酵素を用いることができ、例えばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ベータガラクトシダーゼなどの酵素を好ましく用いることができる。これらの酵素に、化学発光基質あるいは色素基質あるいは蛍光基質を接触させることによってそれぞれ、化学発光、発色、蛍光を放出する。

【0039】

化学発光基質としては、酵素がアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、

・ルシフェラーゼである場合には、特に限定するものではないが、それぞれジオキセタン、ルミノール、ルシフェリンを用いることができる。また、色素基質としては、酵素がアルカリホスファターゼの場合にはパラニトロフェノールリン酸、酵素がペルオキシダーゼの場合には4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬の組合せ、ジアミノベンチジン、テトラメチルベンチジン、酵素がベータガラクトシダーゼの場合にはパラニトロフェニル β -D-ガラクトトシド等を用いることができる。蛍光基質としては、酵素がアルカリホスファターゼの場合4-メチルウンベリフェニルリン酸、酵素がペルオキシダーゼの場合には3-(4-ヒドロキシフェニル)-プロピオン酸、酵素がベータガラクトシダーゼの場合には、4-メチルウンベリフェニル β -D-ガラクトトシド等を用いることができる。

【0040】

特異的結合検出工程の別の態様としては、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、レセプタまたはリガンドを特異的に結合させ、標識物質によって標識された標識体を含む反応溶液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させてレセプタまたはリガンドに標識体を特異的に結合させ、レセプタまたはリガンドを検出する方法があげられる。

【0041】

これは、検出するレセプタまたはリガンドを、吸着性領域のリガンドまたはレセプタと標識体によって挟み込む、いわゆるサンドイッチ法と呼ばれる手法である。ここでいう、レセプタまたはリガンドは、多孔性の吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタと特異的に結合するホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、抗体、抗原、アブザイム、その他のタンパク質、核酸、DNA、mRNAなどの抽出、単離などによって生体から採取された、あるいは、採取された後に化学的処理が施された物質である。

【0042】

標識物質によって標識された標識体とは、前述の標識物質によって標識され、レセプタまたはリガンドの反応部位に特異的に結合することができる抗原、抗体の他、ホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、アブザイム、その他のタンパク質、核

酸、cDNA、DNA、RNAなどであって、特性、組成、構造あるいは塩基配列や塩基の長さなどが既知のものを意味する。

【0043】

特異的結合検出工程のさらに別の態様としては、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットのリガンドまたはレセプタに、補助物質が結合された補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドを特異的に結合させ、補助物質に特異的に結合可能な標識物質を含む反応溶液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させて補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドと特異的に結合させ、補助物質結合レセプタまたは補助物質結合リガンドを標識物質を利用して検出するものである。

【0044】

補助物質は標識物質が結合する物質であって、ジゴキシゲニン、ビオチン、アビジン、フルオロセインなどの抗原、及びこれらの抗原に対する抗体などを好ましくあげることができる。また、ビオチンに対するアビジンのような生物学的結合パートナーであってもよい。結合可能な標識物質は、補助物質に特異的に結合可能であって前述の標識物質によって標識された物質である。

【0045】

次に、本発明の生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法のうち、生化学解析用ユニットの吸着性領域にリガンドまたはレセプタを固定し、抗原（補助物質）で標識された抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドをハイブリダイゼーションなどによって、吸着性領域に固定されたリガンドまたはレセプタと特異的に結合させ、続いて、抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドを標識している抗原に対する抗体を、化学発光を生じさせる酵素で標識し（以下、酵素標識抗体という）、この酵素標識抗体を抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドの抗原と特異的に結合させ、さらに酵素標識抗体の酵素と特異的に結合する化学発光基質を接触させて、化学発光基質と酵素との接触によって生ずる可視光波長領域の化学発光を光電的に検出する化学発光法によるアッセイ法を例に、順を追って説明する。

【0046】

本発明の生化学解析用ユニットを利用した化学発光法では、まず、多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニットの吸着性領域にリガンドまたはレセプタを結合させる。

【0047】

多孔性の吸着性領域に結合されるリガンドまたはレセプタは前述した通りであり、リガンドまたはレセプタは、吸着性領域に滴下した後、紫外線の照射などによって吸着性領域に固定することができる。なお、上述したように、多孔性の吸着性領域にリガンドまたはレセプタがすでに結合されている生化学解析用ユニットを用いる場合には、この段階は省略される。

【0048】

次に、吸着性領域に結合されたリガンドまたはレセプタに抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドを特異的に結合させるが、その前に、抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドを含む反応溶液に溶存している気体を減少させる処理を行う。溶存気体を減少させる気体減少処理を施す装置の例として、図2および図3の装置を示す。

【0049】

図2は、バッチ式の脱気装置である。この装置は、所定の容器に入れた反応溶液10を、均一な気液界面に置くために攪拌機11で緩やかに攪拌を行いながら真空ポンプ12によって大気圧よりも負圧にし、反応溶液10の脱気を行うものである。図3は、連続式の脱気装置である。この装置は、真空ポンプ15によってチューブ14（例えばテフロン（登録商標）製）外部を大気圧よりも負圧にし、ポンプ13によりチューブ14内部に送られた反応溶液10に溶存している気体を、チューブ14の壁を通過させて脱気を行うものである。

【0050】

バッチ式、連続式いずれの場合にも脱気の際には、反応溶液を反応させる温度よりも高い温度下で負圧下にし、脱気を行うことが好ましい。溶存気体は、飽和溶解度の10分の1程度まで減少させることが好ましい。なお、溶存している気体を減少させるこの処理は抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドを含む反応溶液のみではなく、吸着性領域を横切るように強制的に流動させる全ての溶液に

おいで行ってもよい。

【0051】

抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドを含む反応溶液に溶存している気体を減少させる処理を行った後、生化学解析用ユニットを図4に示すような反応溶液を吸着性領域を横切るように強制的に流動させることができ反応容器に取り付け、多孔性の吸着性領域に結合されているリガンドまたはレセプタと特異的に抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンド結合させる。

【0052】

図4は、生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法に用いられる生化学解析装置（リアクタ）の一の実施の形態を示す概略断面図である。リアクタは、反応容器20と流動手段30とからなり、反応容器20は、反応容器上半部21と反応容器下半部22とからなり、反応容器上半部21は反応容器下半部22に取り外し可能に設けられている。また、反応容器20は、リガンドまたはレセプタが結合された多孔性の吸着性領域を有する生化学解析用ユニット1を内部に着脱可能に取り付ける、上側挟持片23と下側挟持片24からなる取付部を有し、生化学解析用ユニット1は反応容器上半部21を取り外すことによってセットすることができるよう構成されている。さらに、反応容器下半部22の底壁には反応溶液が流通可能な溶液流入口25が形成され、反応容器上半部21の頂壁には同様に反応溶液が流通可能な溶液流出口26が形成されている。

【0053】

流動手段30は溶液循環パイプ31とポンプ32から構成され、溶液循環パイプ31の一端は反応容器10の溶液流入口25に、他端は溶液流出口26に取り外し可能に取り付けられている。反応溶液はポンプ32によって溶液流入口25から反応容器20内に入り、生化学解析用ユニット1の吸着性領域4を横切るように強制的に流動した後、溶液流出口26から出て、溶液循環パイプ31を通り循環するよう構成されている。

【0054】

反応溶液に溶存している気体を減少させる処理を行うことによって、キャビテーションによる泡の発生が抑制されても、生化学解析用ユニットの吸着性領域の

微小な空隙に存在する気体が気泡となったり、反応溶液から洗浄液の切り替えの際に気泡が混入したりする可能性があるため、リアクタは、気泡除去手段や、生じた気泡を溶解させる気泡溶解手段を備えているものがより好ましい。

【0055】

図5は、気泡除去手段40を溶液循環パイプ21の分岐に設けた生化学解析装置である。溶液流出口26から出た反応溶液は、溶液循環パイプ31の分岐に設けられた気泡除去手段40に流入され、ここで流動によって生じた気泡が除去される。気泡除去手段としては、網やフィルターなど気泡を捕捉するものを用いることができる。なお、図5では気泡除去手段40を溶液循環パイプ31の分岐に設けた場合を示しているが、図6に示すように溶液循環パイプ31の配管途中に設けてもよい。また、気泡除去手段40に替えて、あるいは気泡除去手段40に加えて気泡を溶解させる気泡溶解手段を設けてもよい。気泡溶解手段も気泡除去手段と同様に、溶液循環パイプ31の分岐あるいは溶液循環パイプ31の配管途中に設けることができる。気泡溶解手段としては、超音波照射槽などを好ましくあげることができる。

【0056】

なお、図4～図6に示す生化学解析装置は、反応溶液が生化学解析用ユニットを循環するタイプのリアクタを示しているが、反応溶液が生化学解析用ユニットの上下を往復流動するものや、あるいは反応溶液が下から上（あるいは上から下）に通過するのみのものなど、反応溶液が循環しないタイプのリアクタを用いることも可能である。

【0057】

反応容器に取り付けた生化学解析用ユニットは、多孔性の吸着性領域に結合されているリガンドまたはレセプタに特異的に結合しなかった抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドを除去するために、吸着性領域にいわゆる洗浄液を強制的に流動させて洗浄することが好ましい。吸着性領域を洗浄液が強制的に流動するので、多孔性の吸着性領域に結合されているリガンドまたはレセプタに特異的に結合していない抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドを、効率的に剥離させ、除去することが可能になり、洗浄効率を大幅に向上することができる。

【0058】

なお、この洗浄工程は、後述する酵素標識抗体を吸着性領域を横切るように強制的に流動させて抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドと特異的に結合させた後、特異的に結合しなかった酵素標識抗体を除去する場合にも行うことが好ましい。これによって、抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドと特異的に結合していない酵素標識抗体を、効率的に剥離させ、除去することが可能になり、洗浄効率を大幅に向上することができる。

【0059】

次に、酵素標識抗体を吸着性領域を横切るように強制的に流動させて抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドと特異的に結合させるが、その前に、酵素標識抗体に対するブロッキングバッファを吸着性領域を横切るように強制的に流動させて吸着性領域をブロッキングすることが好ましい。また、酵素標識抗体は酵素標識抗体に対するブロッキングバッファに添加し、これを吸着性領域を横切るように強制的に流動させて抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドと特異的に結合させることが好ましい。このようにすることによって、吸着性領域のバックグラウンドの発光量をさらに低く抑えることが可能となる。

【0060】

続いて、生化学解析用ユニットを反応容器から取り出して、抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドと特異的に結合した酵素標識抗体に化学発光基質を接触させる。化学発光基質と酵素との接触によって各吸着性領域から可視光波長領域の化学発光を生ずるので、これを光電的に検出して生化学解析用画像データを生成すれば、抗原結合レセプタまたは抗原結合リガンドを検出、測定することができる。

以下に本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0061】

【実施例】

(実施例)

厚み100 μ mのSUS304シート(基板材料シート)によって形成された基板に、18mm×18mmあたり1600個の密度で、0.0007cm²の

・サイズを有する貫通孔を形成した。

【0062】

次に、基板材料シートの片面に接着剤を塗工し、続いて基板材料シートに形成した孔内部に入り込んだ接着剤を吸引除去した後、乾燥した。続いて、基板材料シートの接着剤を塗工した面に、ポアサイズ0.45 μm 、厚み170 μm のナイロン6, 6メンブレンを重ね、150℃に加熱しながら、圧力が1 cm^2 当たり300 kgとなるようにプレスして、基板材料シートの孔内部にナイロン6, 6メンブレンを圧入することで、ステンレス障壁と多数孔のポリマー充填領域とからなる生化学解析用ユニットを作製した。

【0063】

濃度が1 ng/ μl のpBR328-DNA溶液（ロッシュ株式会社製）を熱変性を行ってpBR328-DNAを1本鎖とし、pBR328-DNA溶液を上記で作製した生化学解析用ユニットの吸着性領域に10 nLづつ滴下し、その後紫外線を照射（254 nm、33 mJ/cm²）して吸着性領域に1本鎖のpBR328/BgII, HindIを固定した。

【0064】

100 mLあたり、1Mのリン酸緩衝溶液（100 mLあたりに無水リン酸二ナトリウム7.1 gを含み、リン酸によりpHが7.2に調製された溶液）50 mL、滅菌された純水43 mL、ドデシルスルфон酸ナトリウム7 gの割合で含むハイブリダイゼーションバッファを調製した。調製したハイブリダイゼーションバッファを、図2の装置で、大気圧に対して79.8 kPa（600 Torr）の負圧にし、68℃に加温して、10分間脱気した。ハイブリダイゼーションバッファ中の溶存酸素濃度は、1.5 (mg/L) であった。

【0065】

ジゴキシゲニンで標識されたpBR328-DNA溶液5 ng/ μl をTEバッファによって希釈してジゴキシゲニンによって標識されたpBR328-DNA溶液の濃度を所定値に調製し、熱変性を行って1本鎖にした後、脱気したハイブリダイゼーションバッファによりさらに希釈して、所定の濃度のジゴキシゲニンによって標識されたpBR328-DNA溶液（ハイブリダイゼーション反応

溶液)を調製した。

【0066】

上記生化学解析用ユニットを図5に示す生化学解析装置の反応容器に収容し、ハイブリダイゼーションバッファを反応容器内に供給し、ポンプを駆動して、反応容器およびハイブリダイゼーション反応溶液を68℃に保温しながら、18時間に亘ってハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応終了後、洗浄液を供給し、ポンプを駆動して生化学解析用ユニットの吸着性領域を洗浄した。

【0067】

滅菌された純水で濃度が1/10となるように希釈したウォッシングバッファ(ロッシュ株式会社製)を洗浄液とし、生化学解析用ユニットが収容されている反応容器内に供給し、ポンプを駆動して生化学解析用ユニットの吸着性領域を洗浄液に置換した。

【0068】

続いて、滅菌された純水で濃度が1/10となるように希釈したマレイン酸バッファ(ロッシュ株式会社製)を用いて、ブロッキングバッファ溶液(ロッシュ株式会社製)を濃度が1/10となるように希釈した後、ポリエーテルスルфон製のフィルター($\phi = 0.2 \mu m$)で濾過してブロッキング剤とした。これを反応容器内に供給し、10分間ポンプを駆動して、生化学解析用ユニットの吸着性領域の隅々までブロッキング剤を行き亘らせた後、ポンプを停止し、50分間静置した。

【0069】

次に、アンチジゴキシゲニン-AP-コンジュゲイト(アルカリホスファターゼ標識ジゴキシゲニン抗体)を、ポリビニリデンフルオライド製のフィルター($\phi = 0.22 \mu m$)で遠心濾過後、上記のブロック剤で濃度が1/10000になるように希釈して酵素標識抗体溶液を調製した。これを反応容器内に供給し、1分間ポンプを駆動して、生化学解析用ユニットの吸着性領域の隅々まで酵素標識抗体を行き亘らせて抗原抗体反応をさせた後、ポンプを停止し、1時間静置した。

【0070】

抗原抗体反応の完了後、洗浄液を反応容器内に供給し、ポンプを駆動して生化学解析用ユニットの吸着性領域の隅々まで洗浄バッファを行き亘らせ洗浄を行った。反応容器から生化学解析用ユニットを取り出して、化学発光基質であるCDP-star (CDP-star, read to use: ロッシュ株式会社製) を含む溶液と接触させて、生化学解析用ユニットの吸着性領域から放出される化学発光を冷却CCDカメラ (LAS 1000: 富士写真フィルム社製) によって光電的に検出し、デジタル信号を生成した。

【0071】

(比較例1)

ハイブリダイゼーションバッファの脱気を行わず (ハイブリダイゼーションバッファに溶存している溶存酸素濃度は8 (mg/1)) 、図4に示す生化学解析装置を用いた以外は、実施例1と同様にして化学発光を行い、発光量を検出した。

【0072】

ハイブリダイゼーションバッファ反応溶液に含まれるジゴキシゲニン標識されたpBR328の量に対する検出結果を表1に示す。

【0073】

【表1】

ジゴキシゲニン標識pBR328量 (pg)	実施例		比較例	
	S/N比の平均値	S/N比の変動 (%)	S/N比の平均値	S/N比の変動 (%)
0.1	2.44	22.4	1.1	45.2
0.5	15.1	14.2	3.6	27.4
5	99.4	11.7	35.2	21.3

【0074】

表1から明らかなように、ハイブリダイゼーションバッファの脱気を行い、かつ、気泡除去手段を備えた生化学解析装置を用いて反応を行った実施例では、脱気を行わず、気泡除去手段を備えていない生化学解析装置を用いて反応を行った比較例に比べて、ジゴキシゲニン標識されたpBR328の濃度にかかわらず、

全ての場合において、S/N比が向上し、また吸着性領域の位置によってS/N比の変動（ばらつき）を小さなものとすることができた。

【0075】

以上のように、本発明の生化学解析用ユニットを利用した吸着性領域を横切るように強制的に溶液を流動させるアッセイ法において、強制的に流動させる溶液に、溶存気体を減少させる気体減少処理を施したもの用いるので、あるいは溶液の流動中に、溶液中に存在する気泡を除去する除去処理を行うので、あるいは溶液の流動中に、溶液中に存在する気泡を溶解させる溶解処理を行うので、キャビテーションによる気泡の発生を抑制することができ、吸着性領域の表面に気泡が付着することによって、反応溶液の流れに偏りが生ずることが抑えられ、S/N比の低下や吸着性領域の位置によってS/N比のばらつきが生ずることが緩和された。また、吸着性領域の表面に付着した気泡がその後の標識レセプタまたは標識リガンドの検出の障害になることも抑制することができた。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の化学発光法に用いられる生化学解析用ユニットの概略斜視図

【図2】

バッチ式の脱気装置の概略図

【図3】

連続式の脱気装置の概略図

【図4】

生化学解析用ユニットを利用したアッセイ法に用いられるリアクタの一の実施の形態を示す概略図

【図5】

本発明の生化学解析装置の一の実施の形態を示す概略図

【図6】

本発明の生化学解析装置の別の実施の形態を示す概略図

【符号の説明】

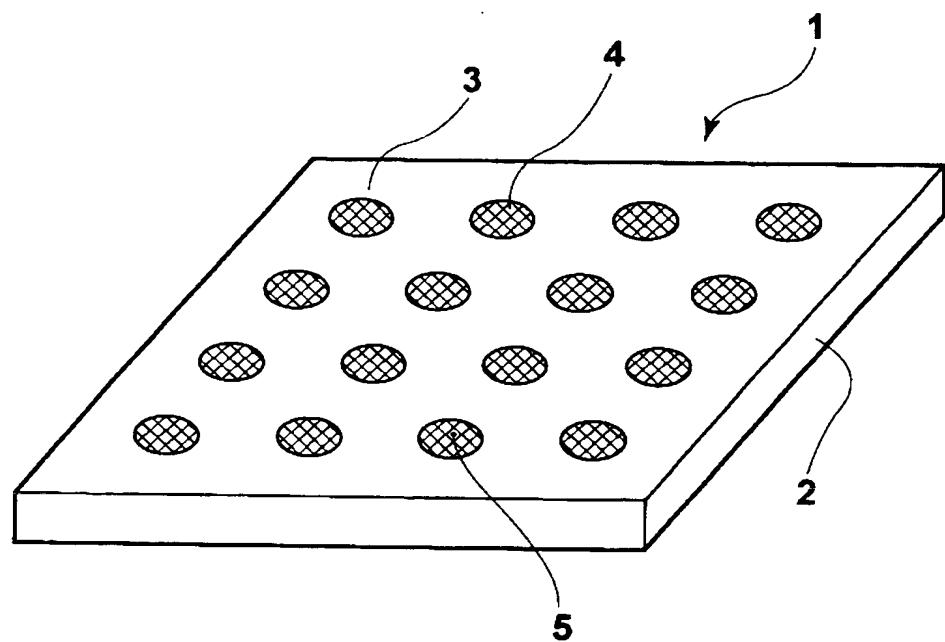
1 生化学解析用ユニット

- 2 基板
- 3 孔
- 4 吸着性領域
- 5 リガンドまたはレセプタ
- 20 反応容器
- 23 上側挟持片
- 24 下側挟持片
- 30 流動手段
- 32 ポンプ
- 40 気泡除去手段

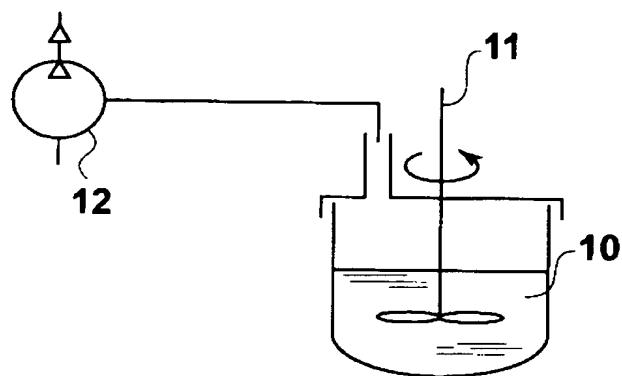
【書類名】

図面

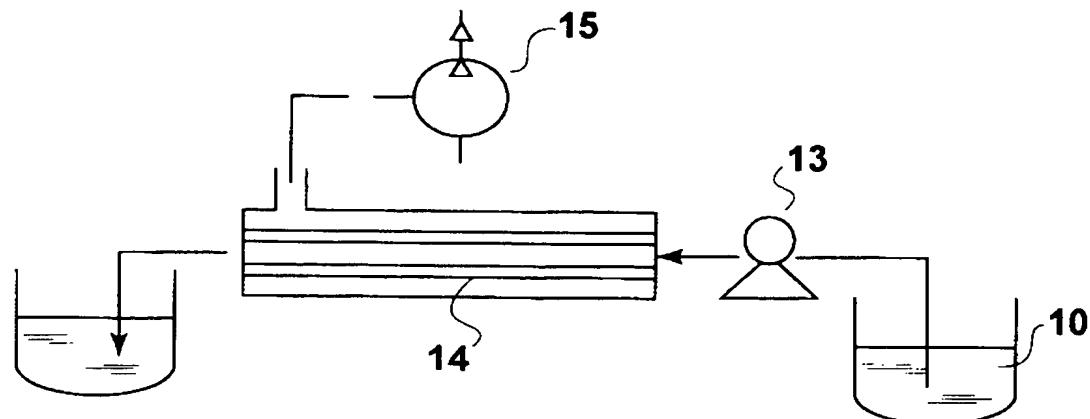
【図 1】



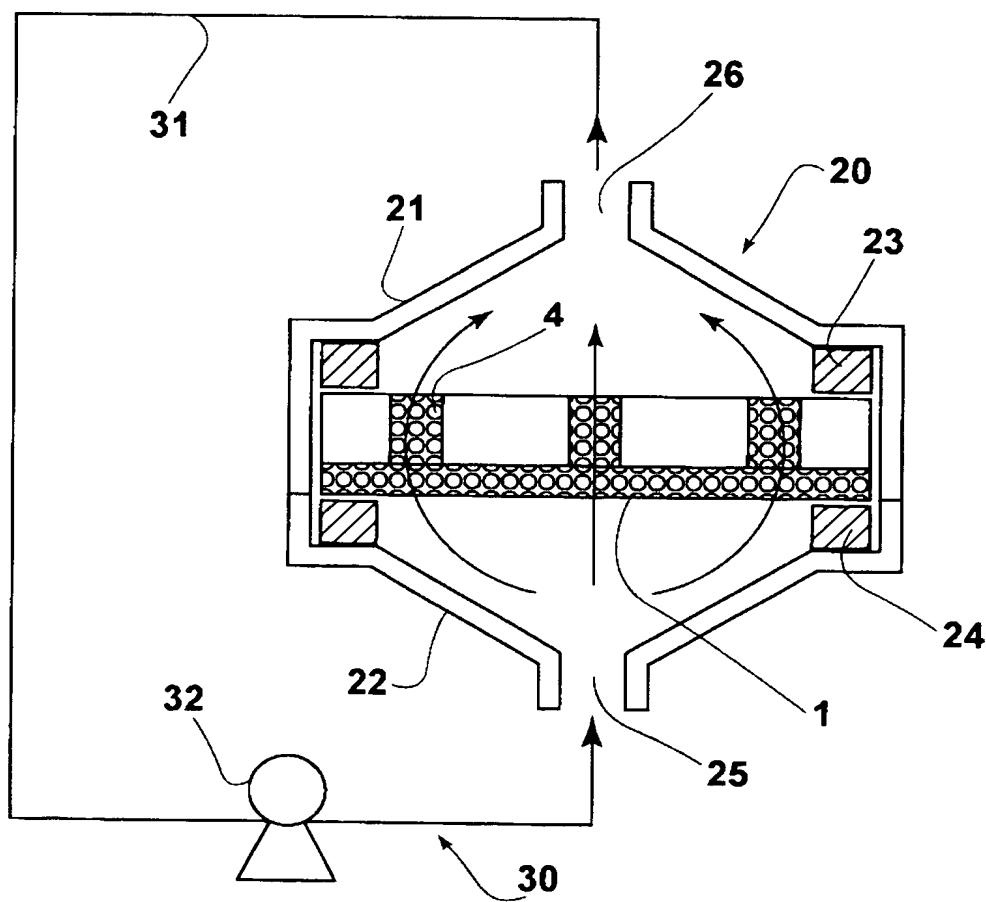
【図 2】



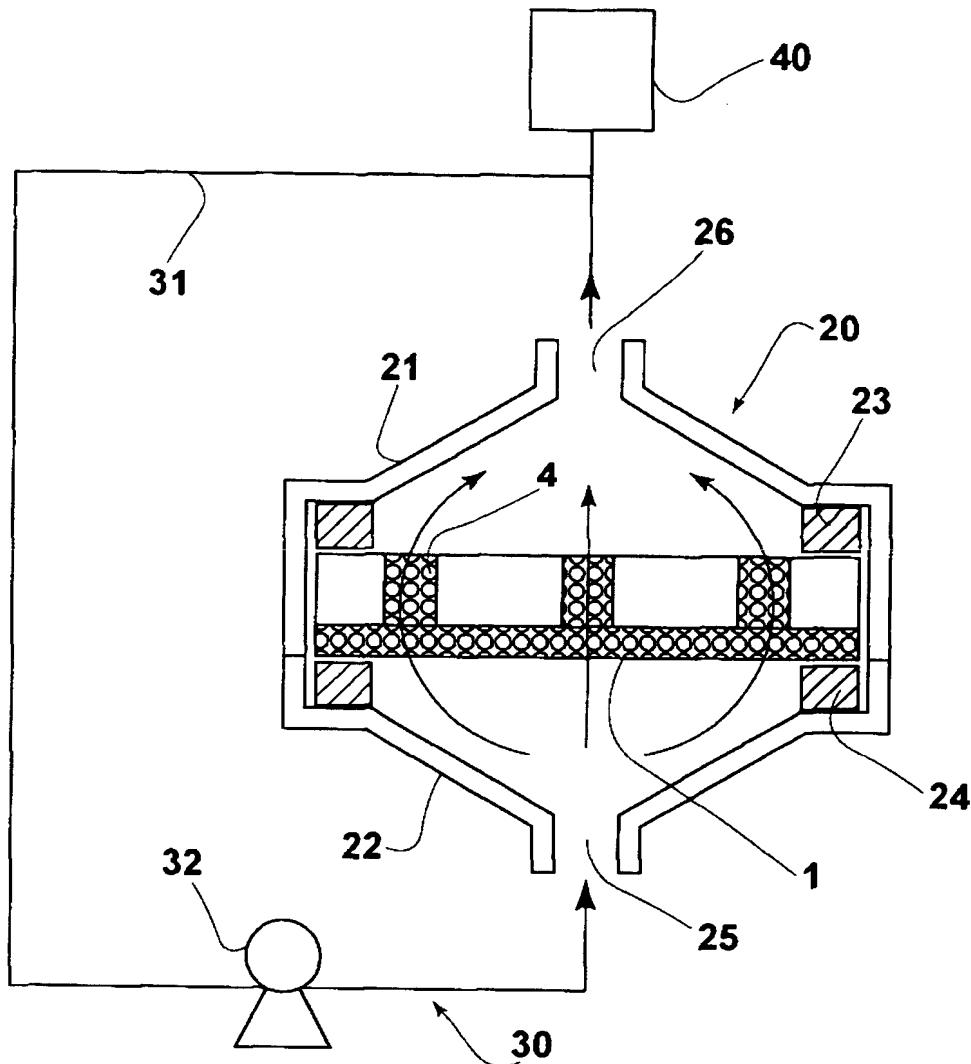
【図3】



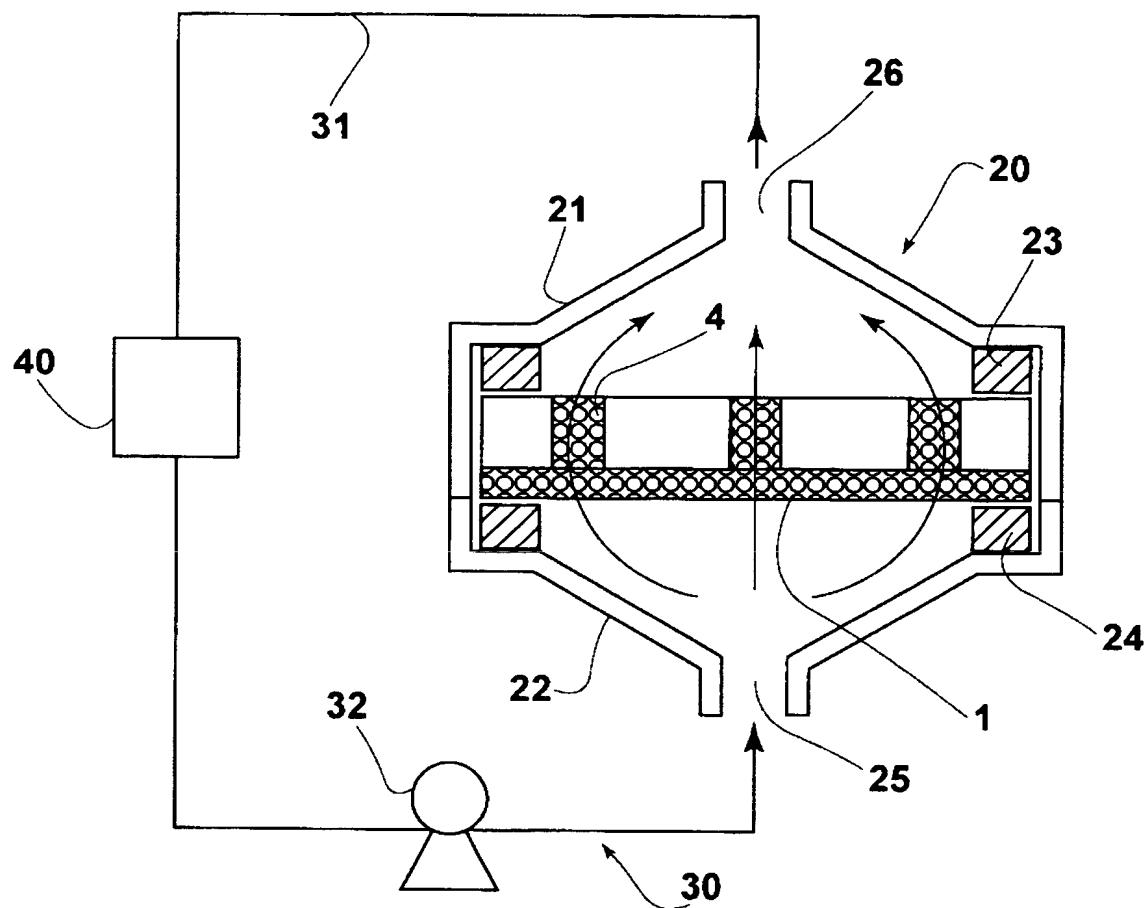
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 反応溶液を強制的に吸着性領域内部に循環させて行う生化学アッセイ法で、S/N比の低下やS/N比のばらつきを抑制する。

【解決手段】 多孔性の吸着性領域を有する滅菌された生化学解析用ユニットの吸着性領域に、リガンドまたはレセプタを結合させる。標識物質により標識された標識レセプタまたは標識リガンドを含む反応溶液に対し溶存気体を減少させる気体減少処理を施す。標識レセプタまたは標識リガンドを含む反応溶液を、吸着性領域を横切るように強制的に流動させて標識レセプタまたは標識リガンドをリガンドまたはレセプタに特異的に結合させる。続いて、酵素標識抗体を標識レセプタまたは標識リガンドと特異的に結合させる。標識レセプタまたは標識リガンドと特異的に結合した酵素標識抗体に化学発光基質を接触させ、この接触によって発生する化学発光を検出する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-309686
受付番号	50201604221
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成14年10月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年10月24日
【特許出願人】	
【識別番号】	000005201
【住所又は居所】	神奈川県南足柄市中沼210番地
【氏名又は名称】	富士写真フィルム株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100073184
【住所又は居所】	神奈川県横浜市港北区新横浜3-18-3 新横浜K Sビル 7階
【氏名又は名称】	柳田 征史
【選任した代理人】	
【識別番号】	100090468
【住所又は居所】	神奈川県横浜市港北区新横浜3-18-3 新横浜K Sビル 7階
【氏名又は名称】	佐久間 剛

次頁無

出証特 2003-3075967

特願 2002-309686

出願人履歴情報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日 1990年 8月14日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名 富士写真フィルム株式会社